

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 14 JAN 2000

PCT/JP 99/06473

19.11.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年11月20日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第34780 09/856319

出願人

Applicant(s):

扶桑薬品工業株式会社

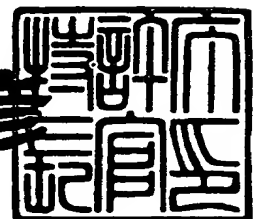
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3089684

【書類名】 特許願

【整理番号】 163446

【提出日】 平成10年11月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00
C07K 14/435
C07K 7/00
C12N 15/00
C12N 15/11
C12N 15/63
A61K 48/00
C12N 9/00
G01N 33/48

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼB S S P 5

【請求項の数】 31

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133

 【氏名】 植村 英俊

【発明者】

 【住所又は居所】 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号

 【氏名】 奥井 文

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府阪南市自然田786-2

 【氏名】 小南 勝也

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町2
85-79

 【氏名】 山口 希

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区北白川西町 8 6 北白川コーポラス
2 0 2 号

【氏名】 三井 真一

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 0 号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証（写） 2

【包括委任状番号】 9700672

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ BSSP5

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 に示すアミノ酸 231 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。。

【請求項 2】 配列番号 1 の塩基番号 1～693 に示す塩基配列、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 3】 配列番号 4 のアミノ酸番号 1～231 に示すアミノ酸 231 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 4 のアミノ酸番号 1～231 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸番号 1～231 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項 4】 配列番号 3 の塩基番号 132～824 に示す塩基配列、配列番号 4 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 4 のアミノ酸番号 1～231 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 5】 配列番号 4 のアミノ酸番号-33～-1 に示すアミノ酸 33 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 4 のアミノ酸番号-33～-1 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 4 のアミノ酸番号-33～-1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタン

パク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

【請求項6】 配列番号3の塩基番号33～131に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはその断片。

【請求項7】 配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸264個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

【請求項8】 配列番号3の塩基番号33～824に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項9】 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項10】 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項11】 請求項2、4、6、8～10のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項12】 請求項2、4、6、8～10のいずれか1つに記載の塩基

配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項13】 請求項2または9のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP5を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

【請求項14】 請求項4、6、8または10のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP5を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

【請求項15】 細胞が、大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項13または14記載の製造法。

【請求項16】 BSSP5遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項17】 BSSP5遺伝子がBSSP5をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項16記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項18】 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項16記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項19】 mBSSP5遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

【請求項20】 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

【請求項21】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項20記載の抗体。

【請求項22】 ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項23】 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンバ

ク質またはその断片に対する抗体と該タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。

【請求項 24】 請求項 1 記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中の h B S S P 5 もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中の h B S S P 5 もしくはその断片を測定する方法。

【請求項 25】 請求項 1 記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化 h B S S P 5 と検体中の h B S S P 5 もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化 h B S S P 5 の量から検体中の h B S S P 5 もしくはその断片の量を検出する、検体中の h B S S P 5 もしくはその断片を測定する方法。

【請求項 26】 検体が体液である、請求項 23～25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 27】 請求項 1、3、5 または 7 のいずれか 1 つに記載のタンパク質を含む、組織における、疾患の診断マーカー。

【請求項 28】 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項 27 記載のマーカー。

【請求項 29】 脳、前立腺、胎盤、精巣、脾臓または脾臓における、癌、炎症の診断に用いる請求項 27 記載のマーカー。

【請求項 30】 精液または精子における、不妊症の診断に用いる請求項 27 記載のマーカー。

【請求項 31】 前立腺における、前立腺肥大症の診断に用いる請求項 27 記載のマーカー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「h B S S P 5」および「m B S S P 5」と称し、両者を区別しない場合は単に「B S S P 5」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、

前駆体および多形性変種ならびにそれらの検出に関する。さらには、hBSSP5およびmBSSP5タンパク質ならびにhBSSP5およびmBSSP5ポリヌクレオチドおよびタンパク質の組成物、それらの製造方法および使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

【0003】

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に関与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体（プロ体）のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、この様なタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

【0004】

例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼ

もしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

セリンプロテアーゼの至適 pH は、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に 30,000 以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

【0005】

最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR により多くの新規プロテアーゼの cDNA およびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamura ら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997)、Gschwend ら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997)、Chen ら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

特開平 9-149790 号の配列番号 3 には新規セリンプロテアーゼ (Neurosin) が開示されており、また Neurosin は Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997 にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いて Neurosin を大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

この様な状況の下、我々はマウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼのクローニングに成功した。ヒト新規セリンプロテアーゼ (hBSSP5) の成熟型はアミノ酸 231 個から成り、マウス新規セリンプロテアーゼ (mBSSP5) の成熟型はアミノ酸 231 個から成り、該前駆体型はアミノ酸 264 個から成ることを証明した。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含有されている。

なお、以下に示す配列表の塩基配列中における「n」記号は、通常の核酸塩基

、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、チミン（t）のいずれかがその位置があることを、アミノ酸配列中における「X a a」は、20種の天然に存在するいずれかのアミノ酸がポリペプチド配列その位置にあることを意味する。

【0007】

ノザン・プロット解析の場合、h B S S P 5は脾臓で発現を示し、m B S S P 5は脾臓で発現が認められた。R T - P C R解析の場合においては、h B S S P 5は胎児の脳、および成人の胎盤で発現が認められ、m B S S P 5は新生児から成体マウスの脳、および成体マウスの精巣で発現が認められた。ゆえに、脳、胎盤、精巣、脾臓および脾臓において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病（AD）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。さらに、本発明の新規セリンプロテアーゼの阻害剤は、アルツハイマー病、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および予防に用いることができる。

【0008】

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-IVの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

【0009】

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

【0010】

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、 $A\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta A P P$ 、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、 $A p o E$ および他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

【0011】

本発明の新規セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

【0012】

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-P A) がある。U-P A はタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素およびコラゲナーゼ等が知られている。

【0013】

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク (A F P

) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タンパク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2 は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と 78% の相同性を有しており、PSA も前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。

【0014】

ゆえに、本発明は、脳、前立腺、胎盤、精巣、脾臓および脾臓等の各種組織において、アルツハイマー病 (AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供する。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明の一つの態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ hBSSP5 および mBSSP5 アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号 2 に示すアミノ酸 231 個から成るアミノ酸配列 (成熟型 hBSSP5 (配列番号 2、アミノ酸番号 1~231)) および該アミノ酸配列をコードする塩基配列 (配列番号 1、塩基番号 1~693) である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列

に1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（例えばカルシウム付加体）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

【0016】

さらに、配列番号4に示すアミノ酸231個から成るアミノ酸配列（成熟型mBSSP5（配列番号4、アミノ酸番号1～231））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号132～824）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0017】

本発明の別の態様は、配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸33個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、33～131）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

【0018】

本発明のさらに別の態様は、成熟体mBSSP5アミノ酸配列（配列番号4）のN末端側に、配列番号4に示す-33～-1までの33個のアミノ酸が付加された、アミノ酸264個から成るアミノ酸配列（前駆体型mBSSP5（配列番号4、アミノ酸番号-33～231））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号33～824）である。また、実質的に配列番号4に示すアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

また、本発明は、配列番号1および3に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、

上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP5、hBSSP5、mBSSP5には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法 (Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) 等を用いることができる。全RNAからのポリ(A)+RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhBSSP5もしくはmBSSP5のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくはcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ (E. coli) RNase H、イー・コリ DNAポリメラーゼ1、イー・コリ DNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0020】

hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP5もしくはmBSSP5発現細胞ポリ(A)+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られ

た遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattencci, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

【0021】

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2もしくは4のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2もしくは4のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および／または挿入を含むと解する。特に、配列番号2もしくは4に示すhBSSP5もしくはmBSSP5成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

【0022】

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2もしくは4のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

【0023】

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導

入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる。

【0024】

さらに、配列番号 1 もしくは 3 のいずれかに記載の塩基配列またはこれらに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明による hBSSP5 もしくは mBSSP5 と同等の性質を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含有される。ストリンジントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液 (0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP)、0.5% SDS および 20 μg/ml 変性サケ精子 DNA を含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて 0.1% SDS 含有 2×SSC で洗浄する条件である。SSC の代わりに適宜 SSPE を使用してもよい。

【0025】

配列番号 1 もしくは 3 のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、hBSSP5 もしくは mBSSP5 遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは PCR の様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも 10 塩基、好適には 15～50 塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは 100 塩基から全長の長さであることが望ましい。

【0026】

さらに、本発明が提供する hBSSP5 もしくは mBSSP5 の cDNA 塩基

配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5' 非翻訳領域、または3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

【0027】

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはそれに相補的なとハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

【0028】

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/19、pFastBAC1 (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばpSecTag2Aベクター、pSecTag2Bベクター (Invitrogen社) を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル核酸配列と、その3' 下流側に、Tag核酸配列、切断可能核酸配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができ

るクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター（本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け特許出願明細書）を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、T a g 塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列 A s p - A s p - A s p - A s p - L y s をコードする塩基配列（当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。）を用いることが好ましい。

【0029】

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞（微生物を含む）が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、C H O 細胞、C O S 細胞、B H K 細胞、V e r o 細胞、ミエローマ細胞、H E K 293 細胞、H e L a 細胞、J u r k a t 細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、S f 9、S f 21、H i g h F i v eTM（登録商標）細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

【0030】

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的

に本発明のタンパク質と同義語である。

【0031】

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP5またはmBSSP5を採取する、hBSSP5またはmBSSP5の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

【0032】

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

【0033】

本発明は、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子とは、hBSSP5もしくはmBSSP5をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP5もしくはmBSSP5の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP5もしくはmBSSP5が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得るこ

とができる。

【0034】

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP5もしくはmBSSP5の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0035】

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0036】

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリAシグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

【0037】

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

【0038】

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP5遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別

し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

【0039】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

【0040】

本発明はまた、hBSSP5もしくはmBSSP5を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2もしくは4のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0041】

本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや

不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

【0042】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP5またはmBSSP6と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Method, 39, 285, 1980, Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981, Nature, 285, 446, 1980)に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

【0043】

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP5もしくはmBSSP5抗原を直接また

は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP5もしくはmBSSP5を加え、固相に結合した抗hBSSP5もしくはmBSSP5モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

【0044】

抗hBSSP5もしくはmBSSP5モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

【0045】

ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行

わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

【0046】

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0~20%のFCSを含む細胞培養用培地(IMDM、DMEM、RPMI1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1~2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

【0047】

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP5もしくはmBSSP5に特

異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7~20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP5もしくはmBSSP5特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP5ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

【0048】

抗hBSSP5またはmBSSP5モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05~2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 α -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 β -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

【0049】

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従

って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0050】

hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP5もしくはmBSSP5を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP5もしくは

は m B S S P 5 またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とにより h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化 h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 と検体中の h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中の h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片を測定する競合法を利用して検体中の h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片を測定する方法が挙げられる。

【0051】

サンドイッチ法による h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体と h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

【0052】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0053】

抗体の固着化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマ

レイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

【0054】

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

【0055】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H_2O_2 を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン- β -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したものも含まれる。

【0056】

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を含む試料あるいはこれらの前駆体もしくはその断片を含む試料であれば限定されない。

【0057】

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分と言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

【0058】

配列番号2に示すアミノ酸配列はアミノ酸231個から成るhBSSP5成熟型あるいは活性型タンパク質であり、これをコードする配列番号1に示す塩基配列は塩基数693個から成る。本発明者らはhBSSP5の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号2に示すものが好ましい。

【0059】

配列番号4に示すアミノ酸配列はアミノ酸264個から成るタイプ1mBSSP5タンパク質であり、それをコードする配列番号3に示す塩基配列は塩基数792個から成る。本発明者らはmBSSP5の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号4に示すものが好ましい。配列番号4のアミノ酸番号-33～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、アミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列は、mBSSP5タンパク質の前駆体型と考えられる。

【0060】

【実施例】

実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社)を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG、2 ; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GAに示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5 μ l、10 \times ExTaqバッファを5 μ l、dNTPを5 μ l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製)を0.5 μ l加え滅菌水で全量を50 μ lとし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで35回PCRを行った。この

PCR産物をTOPO TAクローニングキット(Invitrogen社)添付のpCRII-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp+) プレートに播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクローン、BSSP5遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP5クローン特異的プライマーを作製し、human brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社)を用いてこの試薬に付属するAP1プライマーとGSP1プライマーで94℃、2分を1サイクル、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、30秒を35サイクルするPCRを行った。次に、このPCR産物を1/100に希釈したものを5μl、10×バッファーを5μl、dNTPを5μl、10μMのGSP2プライマーを10pmol、AP2プライマーを10pmol、ExTaqを0.5ユニット、滅菌水で全量を50μlとし、先と同様にPCRを行った。このPCR産物を上記TOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて以下に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にしてcDNA全長を増幅できるような以下に示すプライマーを作製し、human Marathon ready brain cDNAを鋳型としてPCRを行い同一クローンであることを確認し、これをTOPO TAクローニングキットに添付のpCRII-TOPOベクターにクローニングし、全長のcDNAクローンが入ったプラスミドpCRII/hBSSP5を得た。同様にGSP1、GSP2をmouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社)を鋳型にして5' RACE、3' RACE法を行い、クローニングしてマウスの相同性のある遺伝子pCRII/mBSSP5を得た。

【0061】

クローン	プライマー名	向き	配列	用途
------	--------	----	----	----

human BSSP5	hBSSP5F1	Forward	TGCCACGATGTTGCTGCTCA	全長用
	hBSSP5F2	Forward	ATTGTCAACGGGGAGAATGC	mature
	hBSSP5R1/E	Reverse	GGAATTCGGGTCTTTAATGGGTTGAGC	全長用
mouse BSSP5	mBSSP5F1	Forward	ACCATGAACAATGACCTGAC	RACE
	mBSSP5F2	Forward	GAATCAGTGTCGGCAGT	RACE
	mBSSP5F3	Forward	GACCATCTCAACACCATTCC	全長用
	mBSSP5Fmature	Forward	ATTGTCAACGGGGAGAATGC	mature
	mBSSP5.1	Reverse	ATGGCATCGGTAATGCGTGC	RACE
	mBSSP5R2	Reverse	CAGGTGTTTCCCTTCTGGCA	RACE
	mBSSP5R3/E	Reverse	GGAATTCGGACAGTTTAGTTGTAGGCC	全長用

【0062】

実施例2 hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

Balb/cマウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit(Amersham-Pharmacia)のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターをpCRII/mBSSP5よりmBSSP5の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 α - 32 P dCTPで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot (Clontech社製)膜をpCRII/hBSSP5の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 α - 32 P dCTPで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを2×SSC/0.1%SDSで室温30分間、1×SSC/0.1%SDSで室温30分間、0.1×SSC/0.1%SDSで65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート(富士フイルム社)に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot (Clontech社製)膜を用いた結果(図1)および生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製したmRNAを用いた結果(図2)を示す。また、上記で作製したmRNAをReady To Go RT-PCR Beads(Amersham-Pharmacia)を用いてキット添付のプロトコル通りにhBSSP5およびmBSSP5について遺

伝子特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。図1および図2から、ノザン・プロット解析の場合、hBSSP5は脾臓で発現を示し、mBSSP5は脾臓で発現が認められた。また、RT-PCR解析の場合、hBSSP5は胎児の脳、および成体の胎盤で発現が認められ、mBSSP5は新生児から成体マウスの脳および精巣で発現が認められた。ゆえに、脳、胎盤、脾臓、脾臓および精巣において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。

【0063】

実施例3 hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

(1) 発現プラスミドの構築

プラスミドpCRII/hBSSP5またはpCRII/mBSSP5をテンプレートに、hBSSP5タンパク質またはmBSSP5タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域をPCR反応にて増幅した。このPCR産物をそれぞれpTrc-HisB(Invitrogen)をBamHIで消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌DH5 α を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミドpTrcHis/hBSSP5およびpTrcHis/mBSSP5を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれE. coli pTrcHis/hBSSP5およびE. coli pTrcHis/mBSSP5と命名し、1998年10月29日より、受託番号FREM P-17038およびFREM P-17035の下、工業技術院生命工学技術研究所に委託してある。

【0064】

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを10mlのLB(Amp^r+)培地に接種し、一晚37℃で培養した。これを250mlのLB(Amp^r+)培地に接種し、37℃で培養した。600nmの吸光度が0.5になった時、250 μ lの0.1M IPTG(イソプロピル- β -D(-)チオガラクト

トピラノシド)を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー(10mMリン酸バッファー pH7.5、1mM EDTA)で懸濁し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファーで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファー(8M Urea、50mM Tris pH8.5、20mM 2ME)で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin(Clontech社製)に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物をPBSで一晩おきにバッファー交換しながら3日間透析し、タンパク質hBSSP5-HisおよびmBSSP5-Hisを得た。

【0065】

実施例4 BSSP5遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/hBSSP5を用いた発現

(1) pFBTrypSigTag/hBSSP5の作製

配列番号5と6をアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A(Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

【0066】

特開平9-14790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、pSPORT/ニューロシンをクローニングした。pSPORT/ニューロシンより、配列番号7および8を用いてP

CRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10 unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARA ライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た(図3)。

【0067】

配列番号9及び10によりpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号10及び11によって増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した(図4A)。

【0068】

pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号8と12を用いたPCRによって作製したcDNAをBglIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号8と13を用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。

【0069】

5 μ gのpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

【0070】

E. coli pTrcHis/hBSSP5(受託番号FERM P-17

038) から得られる pTrcHis/hBSSP5 または pCRII/hBSSP5 より定法に従い PCR を行い、hBSSP5 の活性体領域の cDNA を得た。得られた cDNA を pFBTrypSigTag に挿入し pFBTrypSigTag/hBSSP5 を得た (図4B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しく hBSSP5 が挿入されているかを確認した。

【0071】

pFBTrypSigTag/hBSSP5 を Gibco BRL BAC-TO-BAC baculovirus expression system のプロトコールに従ってバクミド DNA 上に Trypsinogen signal peptide, His tag, 及び エンテロキナーゼ 認識部位を融合した キメラ hBSSP6 を持つ 組み換えバクミドを作製した。これを BAC-TO-BAC baculovirus expression system のマニュアルに従い Sf-9 細胞で発現させたところ、ウィルス感染後 2 日目より培養上清中に分泌された。

E. coli pTrcHis/mBSSP5 (受託番号 FERM P-17035) から得られる pTrcHis/mBSSP5 または pCRII/mBSSP5 を用いて、上記と同様に pFBTrypSigTag/mBSSP5 を作製し、分泌させることができる。

【0072】

酵素活性の測定

この培養上清中に得られた 組換え融合タンパク質 hBSSP5 を キレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清を PBS バッファーを用いて キレートカラム (Ni-NTA-Agarose, Qiagen 社製) に供し、PBS に イミダゾール (和光純薬工業) を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られた イミダゾール溶出分画を、さらに PD-10 カラム (Pharmacia 社製) で PBS バッファーに交換した。このサンプル 50 μ L に エンテロキナーゼ (1U/1 μ L, Invitrogen 社製) 10 μ L を混和し、室温で 60 分反応させた。次に各種合成基質 (ペプチド研究所) を DMSO に溶解し、1M Tris-HCl, (pH 8.0) で希釈した 0.2M 基質溶液を 50 μ L 加え、さらに、37℃ で反応した。1 時間後に 励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm における、酵素作用に生じる AMC (7-アミノ-4-メチ

ルクマリン) の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

【配列表】

<110> Fuso Yakuhin Kogyo Kabushikigaisya

<120> Novel serine protease BSSP5

<130> 163446

<160> 13

<210> 1

<211> 1040

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 97, 494, 502

<223> n i s a , t , c o r g .

<400> 1

```

att gtc aac ggg gag aat gca gtg ttg ggc tcc tgg ccc tgg cag gtg tcc 51
Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Leu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser
  1           5           10           15
ctg cag gac agc agc ggc ttc cac ttc tgc ggt ggt tct ctc atc ngc cag 102
Leu Gln Asp Ser Ser Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Xaa Gln
      20           25           30
tcc tgg gtg gtc act gct gcc cac tgc aat gtc agc cct ggc cgc cat ttt 153
Ser Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Asn Val Ser Pro Gly Arg His Phe
  35           40           45           50

```


gtt gtc ctg ggc gag tat gac cga tca tca aac gca gag ccc ttg cag gtt 204
 Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser Ser Asn Ala Glu Pro Leu Gln Val
 55 60 65
 ctg tcc gtc tct cgg gcc att aca cac cct agc tgg aac tct acc acc atg 255
 Leu Ser Val Ser Arg Ala Ile Thr His Pro Ser Trp Asn Ser Thr Thr Met
 70 75 80 85
 aac aat gac gtg acg ctg ctg aag ctc gcc tcg cca gcc cag tac aca aca 306
 Asn Asn Asp Val Thr Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Ala Gln Tyr Thr Thr
 90 95 100
 cgc atc tcg cca gtt tgc ctg gca tcc tca aac gag gct ctg act gaa ggc 357
 Arg Ile Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser Ser Asn Glu Ala Leu Thr Glu Gly
 105 110 115
 ctc acg tgt gtc acc acc ggc tgg ggt cgc ctc agt ggc gtg ggc aat gtg 408
 Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Gly Val Gly Asn Val
 120 125 130 135
 aca cca gca cat ctg cag cag gtg gct ttg ccc ctg gtc act gtg aat cag 459
 Thr Pro Ala His Leu Gln Gln Val Ala Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln
 140 145 150
 tgc cgg cag tac tgg gac tca agt atc act gac tnc atg atc ngg gca ggt 510
 Cys Arg Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Ile Thr Asp Xaa Met Ile Xaa Ala Gly
 155 160 165 170
 ggc gca ggt gcc tcc tcg tgc cag ggt gac tcc gga ggc cct ctt gtc tgc 561
 Gly Ala Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 175 180 185
 cag aag gga aac aca tgg gtg ctt att ggt att gtc tcc tgg ggc acc aaa 612
 Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys
 190 195 200
 aac tgc aat gtg cgc gca cct gct gtg tat act cga gtt agc aag ttc agc 663
 Asn Cys Asn Val Arg Ala Pro Ala Val Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser

205	210	215	220	
acc tgg atc aac cag gtc ata gcc tac aac tga gctcaccaca ggccctcccc				716
Thr Trp Ile Asn Gln Val Ile Ala Tyr Asn				
225	230			
agctcaaccc atttaaagga cccaggccct gtcccatcat gcattcatgt ctgtcttcct				776
ggctcaggag aaagaagagg ctgttgaggg tccgactccc tacttggact tctggcacag				836
aaggggctga gtgactcctt gagtagcagt ggctcttcct agagtagcca tgccgtggcc				896
ggggccccc cccctcctcc agggcaaccc cttggtccta cagcaagaag ccagaactgt				956
tggaatgaat ggcagccctc cttggagagg cagcctgttt actgaataca gaggatacgt				1016
ttacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa				1040

<210> 2

<211> 231

<212> PRT

<213> human

<220>

<221> UNSURE

<222> 33, 165, 168

<223> Xaa is an amino acid.

<400> 2

Ile	Val	Asn	Gly	Glu	Asn	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser
1							5						10			15
Leu	Gln	Asp	Ser	Ser	Gly	Phe	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Xaa	Gln
				20				25					30			
Ser	Trp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Asn	Val	Ser	Pro	Gly	Arg	His	Phe
35					40				45					50		
Val	Val	Leu	Gly	Glu	Tyr	Asp	Arg	Ser	Ser	Asn	Ala	Glu	Pro	Leu	Gln	Val
				55					60					65		

Leu Ser Val Ser Arg Ala Ile Thr His Pro Ser Trp Asn Ser Thr Thr Met
 70 75 80 85
 Asn Asn Asp Val Thr Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Ala Gln Tyr Thr Thr
 90 95 100
 Arg Ile Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser Ser Asn Glu Ala Leu Thr Glu Gly
 105 110 115
 Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Gly Val Gly Asn Val
 120 125 130 135
 Thr Pro Ala His Leu Gln Gln Val Ala Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln
 140 145 150
 Cys Arg Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Ile Thr Asp Xaa Met Ile Xaa Ala Gly
 155 160 165 170
 Gly Ala Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 175 180 185
 Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys
 190 195 200
 Asn Cys Asn Val Arg Ala Pro Ala Val Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser
 205 210 215 220
 Thr Trp Ile Asn Gln Val Ile Ala Tyr Asn
 225 230

<210> 3

<211> 834

<212> DNA

<213> mouse

<400> 3

gaccatctca acaccattcc ttatttgtca ca atg cta ctg ctc agc cta acc ctt 56

Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu

-30

agc ctg gtc ctc ctt ggc tcc tcc tgg ggc tgt ggt gtt cct gcc atc acg 107
 Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Cys Gly Val Pro Ala Ile Thr
 -25 -20 -15 -10
 cct gca ctg agc tac aat cag aga att gtc aac ggg gag aat gca gtg cca 158
 Pro Ala Leu Ser Tyr Asn Gln Arg Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Pro
 -5 -1 1 5
 ggc tcc tgg ccc tgg cag gtg tct ctc cag gat aac acc ggc ttc cac ttc 209
 Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Asp Asn Thr Gly Phe His Phe
 10 15 20 25
 tgc ggt ggt tct ctc atc agt ccg aac tgg gtg gtc acg gct gcc cac tgc 260
 Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys
 30 35 40
 caa gtc acg cct gga cgc cac ttt gtc gtt ttg gga gaa tat gac cga tct 311
 Gln Val Thr Pro Gly Arg His Phe Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser
 45 50 55 60
 tcc aat gct gaa cct gtg cag gtc ctc tcg atc gca agg gcc atc aca cac 362
 Ser Asn Ala Glu Pro Val Gln Val Leu Ser Ile Ala Arg Ala Ile Thr His
 65 70 75
 cct aac tgg aac gcc aac acc atg aac aat gac ctg act ctc ctg aag ctt 413
 Pro Asn Trp Asn Ala Asn Thr Met Asn Asn Asp Leu Thr Leu Leu Lys Leu
 80 85 90
 gcc tcg cca gcc cgg tac aca gca caa gtc tca cca gtc tgc ctg gct tcc 464
 Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Thr Ala Gln Val Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser
 95 100 105 110
 aca aac gag gca ctg cct tcg ggg ctc acc tgt gtc acc act ggc tgg ggc 515
 Thr Asn Glu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly
 115 120 125
 cga atc agt ggt gtg ggc aat gtg aca cca gct cgc ctg cag caa gtt gtt 566

Arg Ile Ser Gly Val Gly Asn Val Thr Pro Ala Arg Leu Gln Gln Val Val
 130 135 140 145
 cta ccc ctg gtc act gtg aat cag tgt cgg cag tac tgg ggt gca cgc att 617
 Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln Cys Arg Gln Tyr Trp Gly Ala Arg Ile
 150 155 160
 acc gat gcc atg ata tgt gca ggt ggc tca ggc gcc tcc tca tgt cag ggt 668
 Thr Asp Ala Met Ile Cys Ala Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly
 165 170 175
 gac tca gga ggc cct ctt gtc tgc cag aag gga aac acc tgg gtg ctt att 719
 Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile
 180 185 190 195
 ggg att gtc tcc tgg ggc act aag aac tgc aac ata caa gca ccg gcc atg 770
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys Asn Cys Asn Ile Gln Ala Pro Ala Met
 200 205 210
 tac act cgg gtc agc aag ttc agt acc tgg atc aac caa gtc atg gcc tac 821
 Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser Thr Trp Ile Asn Gln Val Met Ala Tyr
 215 220 225 230
 aac taaactgtcc 834

Asn

<210> 4

<211> 264

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu

Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Cys Gly Val Pro Ala Ile Thr
 -25 -20 -15 -10
 Pro Ala Leu Ser Tyr Asn Gln Arg Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Pro
 -5 -1 1 5
 Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Asp Asn Thr Gly Phe His Phe
 10 15 20 25
 Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys
 30 35 40
 Gln Val Thr Pro Gly Arg His Phe Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser
 45 50 55 60
 Ser Asn Ala Glu Pro Val Gln Val Leu Ser Ile Ala Arg Ala Ile Thr His
 65 70 75
 Pro Asn Trp Asn Ala Asn Thr Met Asn Asn Asp Leu Thr Leu Leu Lys Leu
 80 85 90
 Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Thr Ala Gln Val Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser
 95 100 105 110
 Thr Asn Glu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly
 115 120 125
 Arg Ile Ser Gly Val Gly Asn Val Thr Pro Ala Arg Leu Gln Gln Val Val
 130 135 140 145
 Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln Cys Arg Gln Tyr Trp Gly Ala Arg Ile
 150 155 160
 Thr Asp Ala Met Ile Cys Ala Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly
 165 170 175
 Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile
 180 185 190 195
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys Asn Cys Asn Ile Gln Ala Pro Ala Met
 200 205 210
 Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser Thr Trp Ile Asn Gln Val Met Ala Tyr

215

220

225

230

Asn

<210> 5

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 5

AAG CTT GGC TAG CAA CAC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CCT TAC CTT TGT TGC 51

TGC TGC TGT TGC TGC CCC CTT TGA CGA CGA TGA CAA GGA TCC GAA TTC 99

<210> 6

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 6

GAA TTC GGA TCC TTG TCA TCG TCG TCA AAG GGG GCA GCA ACA GCA GCA GCA 51

ACA AAG GTA AGG ATC AGG AGT AGA TTC ATG GTG TTG CTA GCC AAG CTT 99

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 7	
TTG GTG CAT GGC GGA	15
<210> 8	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequence of synthetic primer for amplification	
<400> 8	
TCC TCG AGA CTT GGC CTG AAT GGT TTT	27
<210> 9	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequence of synthetic primer for amplification	
<400> 9	
GCG CTA GCA GAT CTC CAT GAA TCT ACT CCT GAT CC	35
<210> 10	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequence of synthetic primer for amplification	
<400> 10	

TGA AGC TTG CCA TGG ACC AAC TTG TCA TC 29

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 11

CCA AGC TTC ACC ATC ACC ATC ACC AT 26

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 12

GCA CAG TCG AGG CTG AT 17

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of synthetic primer for amplification

<400> 13

CAA ATG TGG TAT GGC TG 17

【図面の簡単な説明】

【図 1】 human multiple tissue blot膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図 2】 マウスの各種臓器からの mRNA を用いたノザンブロットの結果を示す。

【図 3】 実施例 4 の方法により構築したプラスミド。

【図 4】 実施例 4 の方法によるプラスミドの構築図。

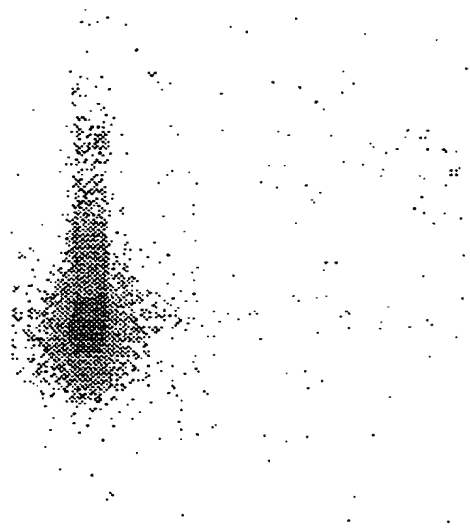
【書類名】

図面

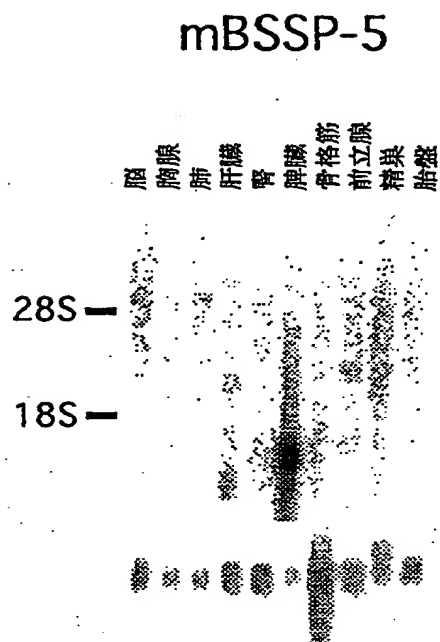
【図 1】

hBSSP-5

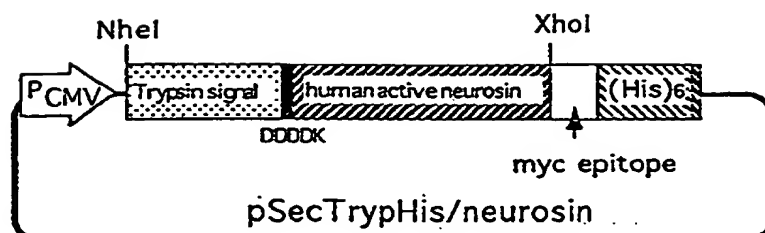
脾臓 腎 骨格筋 肝臓 肺 胎盤 脳 心臓



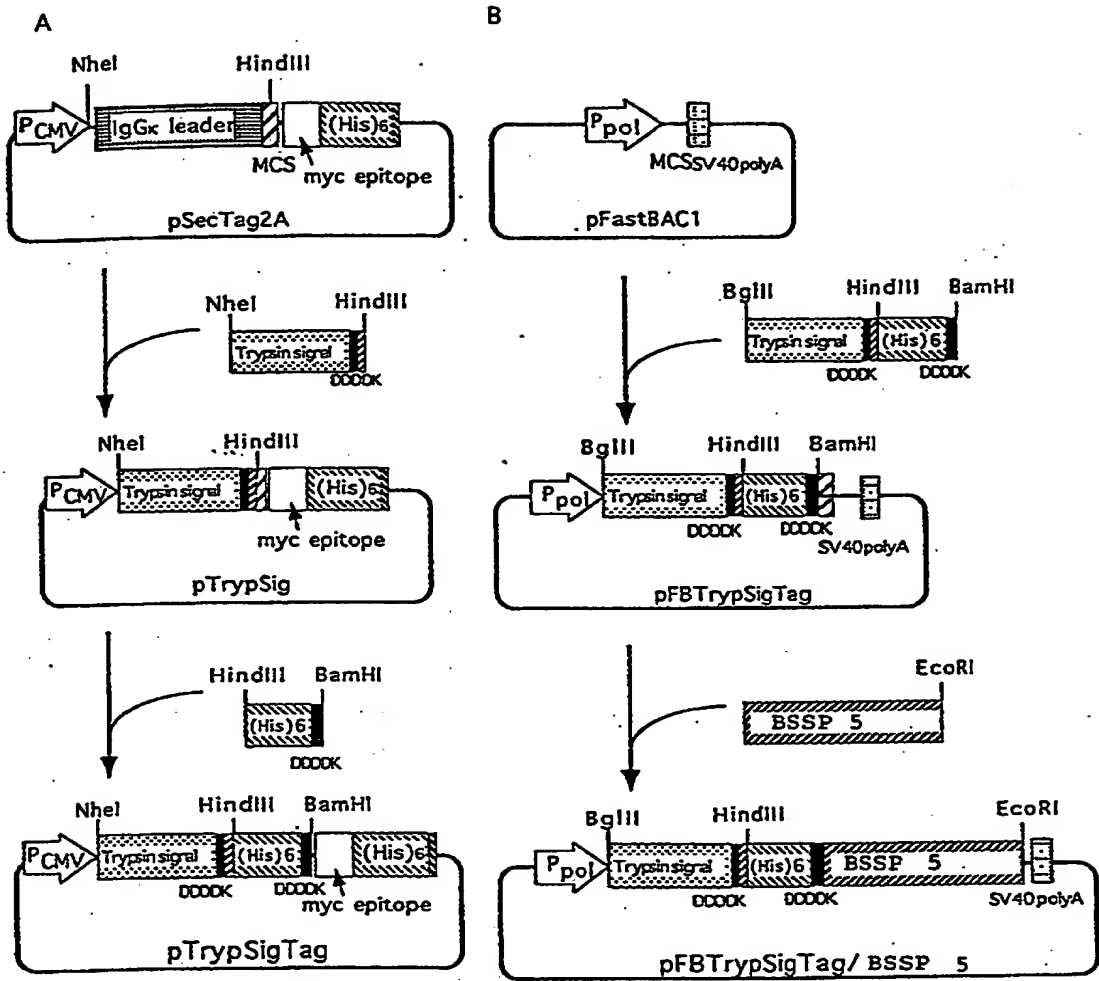
【図2】



【図 3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼ（BSSP5）を提供する。

【解決手段】 配列番号2および4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP5の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP5に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP5の検出方法を提供する。

【選択図】 なし



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1373号

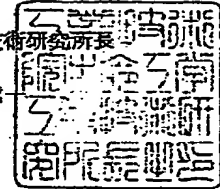
通知年月日: 平成 10 年 10 月 29 日

扶桑薬品工業株式会社
取締役社長 戸田 幹雄

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 著 信



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p>E. coli pTrcHis/mBSSP5</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 17035</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p>■ 科学的性質</p> <p>■ 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 10 年 10 月 29 日に受領した1欄の微生物を受託する。</p>	



書式 7

受 託 証

通知番号 : 10 生寄文 第 1376号

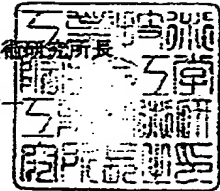
通知年月日: 平成 10 年 10 月 29 日

扶桑薬品工業株式会社
取締役社長 戸田 幹雄

殿

工業技術院生命工学工業技術研究所長

大 署 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) E. coli pTrcHis/hBSSP5	(受託番号) FERM P- 17038
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
当所は、平成 10 年 10 月 29 日に受領した1種の微生物を受託する。	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000238201
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100062144
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ
ル 青山特許事務所
【氏名又は名称】 青山 葆
【選任した代理人】
【識別番号】 100081422
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビ
ル 青山特許事務所
【氏名又は名称】 田中 光雄
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 受託証 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000238201]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名 扶桑薬品工業株式会社

